

Alessandra Maria Duarte Barauna

**ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DE STI1 NA
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL
TRUNCAL, *IN VITRO***

Monografia submetida ao curso de
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Licenciada em
Biologia
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho
Garcez

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária
da UFSC.

Barauna, Alessandra Maria Duarte
ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DE STI1 NA
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL,
IN VITRO / Alessandra Maria Duarte Barauna ;
orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2017.
68 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Biologia Celular. 3.
Diferenciação Celular. 4. Crista Neural. 5. STI1. I.
Garcez, Ricardo Castilho. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas.
III. Título.

Alessandra Maria Duarte Barauna

**ESTUDO SOBRE A INFLUÊNCIA DE STI1 NA
DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CRISTA NEURAL
TRUNCAL, *IN VITRO***

Esta Monografia foi julgada adequada para obtenção do Título de
Licenciada e aprovada em sua forma final pelo Curso de Ciências
Biológicas

Florianópolis, 12 de dezembro de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Bianca Luise Teixeira.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni.
Universidade Federal de Santa Catarina

Para Lucas Nunes (*in memoriam*)
Que Deus continue abençoando o rolê

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, aos órgãos de fomento CAPES, CNPQ, FAPESC e FUGARP (Fundação Garcez de Apoio a Pesquisa). Assim como o Centro de Ciências Biológicas, ao Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) e ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

Ao meu querido orientador Ricardo Castilho Garcez por acreditar em mim até quando eu não acreditava. Por toda sua paciência e dedicação como professor, pesquisador, orientador e nas horas vagas, pai adotivo de 4 orientandos. Muito obrigada pelos seus puxões de orelha, conselhos e conversas sobre a vida, o universo e tudo mais. Você é um exemplo de caráter e profissionalismo.

Ao meu colega de bancada Gabriel da Silva Pescador por todo o apoio que tem me dado, tanto na vida profissional como na pessoal. Obrigada por ser meu ombro amigo pras horas que eu estava a beira de um surto, pelos conselhos sobre este trabalho ou ainda, pelas conversas de bar e piadas que mais ninguém entende. Eu realmente falo a verdade quando digo que sentirei sua falta quando você nos deixar.

As minhas amigas ‘lipídicas’ Fernanda ‘Mãe’ Freitas e Jaqueline ‘Solzinho’ da Cunha, vocês alegram meu dia. Muito obrigado por estarem ao meu lado sempre sorrindo e emanando boas vibrações. Como os ‘nomes’ já dizem, Fer, você é quase uma mãe pra mim, obrigada por ser sempre tão doce. E Jaque, você é o solzinho da minha vida, sempre alegre e iluminando até os dias mais nublados.

A minha parceira de graduação e de vida, Maiarinha Marques. Você tem me aguentado há alguns anos já, não é?! Estágios, laboratório, vizinhança, graduação e bares. Como costume dizer, somos quase um casal. Obrigada por todo o suporte e carinho que você tem me dado.

A Priscilla Barros Delbem, também conhecida como senhorita Senescência. Muito obrigada por todos os conselhos e por ser psicóloga nas horas vagas. Além de ser a única pessoa que conhece e assiste as mesmas séries que eu. Vida longa e próspera, minha jovem Padawan.

Aos meus colegas Lacertianos Aruana Hansel, Adriane Fagundes Camila Acordi, Diana Heck, Bianca Teixeira, Talita Jeremias, Juliano Tibola, Diego Amarante, Matheus Reck, Gisele Varela, Gabriel Trajano. Vocês me ajudaram muito durante toda essa caminhada e fizeram meus dias mais felizes.

Ao meu antigo orientador Giordano Wosgrau Calloni, por me introduzir nessa vida acadêmica e me mostrar como a crista neural é linda e como é possível você trabalhar com algo que lhe dá brilho nos olhos.

A minha antiga coorientadora, Alice Prompt, por ser sempre uma mãe coruja e cuidar de mim enquanto estava em suas mãos.

Aos professor e amigo Davi de Codes, por sua calma que me acalma. Muito obrigada pelas infinitas palavras de sabedoria e por me ouvir quando eu mais precisei.

Ao meu amigo Eduardo Blank que me ajudou tanto nessa graduação e mesmo antes dela. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar. Sinto sua falta, Baby Blank.

Aos meus amigos de graduação Fernando Santos Cabral e Sabrina Saturnino Rodrigues, obrigada por me aguentarem por tanto tempo. Vocês são um exemplo de superação, porque nem eu consigo às vezes. Sinto falta de nossas aulas de zoologia juntos, onde a gente tinha ataques de riso, lembram?! Ou ainda nossas idas a La Toscana pra ficar durante 3 horas comendo pizza e voltar cantando músicas que o Fernandinho odiava. Quero levar vocês comigo pro resto de minha vida.

Aos meus amigos ‘pelegos’: Daiane Masson, Aléxia ‘Beyoncé’ Guimarães, Nathan ‘Pinchernaldo’, Ranieri ‘Ranj’ Althoff, Nicholas ‘Sheldon’ Auler, Lucas ‘Aqua’ Florindo, vocês fizeram o fim da minha graduação muito melhor. Gostaria de ter conhecido-os antes, para conseguir passar mais tempo com vocês. Muito obrigada pelos *afters* e esquentas lá em casa, pelos abraços demorado, pelas palavras de confiança e por estarem ao meu lado num dos momentos mais difíceis de minha vida. Um agradecimento especial ao Plínio ‘Preso Amanhã’ Oliveira, por se preocupar tanto comigo e me dar apoio em situações tão complicadas que passei neste último semestre. Obrigada, seus chatos.

Aos amigos de longe que estão sempre por perto, Fabíola ‘Fabisteca’ da Rosa que mesmo longe, sempre dá um jeito de estar presente. Obrigada por tudo, principalmente pelos brownies e pelas consultas de graça, minha Pequena. A ‘Natralha’ Villamil e ‘Brunão’ Florian, vocês são o melhor bonde que poderia existir. Obrigada por sempre estarem comigo nas horas boas e ruins. Sinto saudades da nossa época de solteiras e da nossa viagem ao Rosa. Ao Felipe da Silva Pires, que sem dúvida, é a pessoa que me conhece a mais tempo e provavelmente, que me conhece melhor. Muito obrigada pelas horas e horas de conversa sobre a vida e por seu apoio nos últimos tempos, ele foi fundamental pra minha vida.

As pessoas mais legais da Ciência da Computação: Caio Oliveira, Monique Bertan e Gustavo Moser, muito obrigada por serem meus amorzinhos e continuarem sendo meus amigos depois de tudo. Sinto a falta das horas e horas de conversas sem nada pra fazer no Calico e nos Chiccos da vida. Quando estou com vocês, sinto que a vida pode ser mais leve. Sinto a falta de vocês, mesmo.

Ao meu namorado Victor Hass, por todo o apoio e amizade. Você chegou em um tempo extremamente sombrio de minha vida, mas de algum jeito, você deu conta de cuidar de mim e teve paciência para esperar minhas feridas cicatrizarem. Você esteve comigo em situações inimagináveis em tão pouco tempo que nem parece que estamos juntos há poucos meses. É estranho pensar que um dia meu coração pertenceu a outra pessoa. É tu, seu mau humorado.

As pessoas que já não estão nesse plano, mas que marcaram minha vida de uma maneira que sem elas, tudo seria diferente: Ao meu avô Josias José Duarte, que apesar de ter ficado por pouco tempo em minha vida, me mostrou o verdadeiro significado de amor verdadeiro e altruísta. A minha tia Dulce Barauna, por ter sempre me recebido de braços abertos e sorriso no rosto. Meus passeios para o interior só eram divertidos por sua causa. E ao meu estimado amigo Lucas Nunes, que infelizmente ficou tão pouco tempo nesta dimensão, mas o bastante para que marcasse de maneira tão significativa. Obrigada pelas suas últimas palavras, você tinha razão.

Aos meus irmãos Elisiane Duarte, Willian da Silva, Victor Conink, a minha sobrinha Amanda Medeiros e aos meus primos Priscila e Cristian Rossi que sempre me apoiaram e me admiraram, sem vocês, eu acho que eu não estaria aqui.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais Artur Barauna Filho e Aurenir Sandra Duarte, por toda educação que me deram, por sempre acreditarem em mim e por me deixarem ir, mesmo que isso significasse noites mal dormidas por causa do choro e preocupação. Obrigada por sempre colocarem meus sonhos a frente dos seus, por sempre realizarem os seus sonhos através dos meus, mesmo que isso significasse ficar sem carro novo ou reforma na casa. Obrigada por estarem sempre ao meu lado, todas as horas por dia. Eu sinto falta de vocês. De todos os abraços, de todo o carinho, de toda vez que dormíamos juntos, do cheiro do feijão de sábado e da graxa depois de um dia de trabalho. Vocês são meu exemplo e inspiração. Eu apenas estou aqui e permaneço por vocês. Obrigada.

Do fundo desta noite que persiste
A me envolver em breu - eterno e espesso,
A qualquer Deus - se algum acaso existe,
Por mi'alma insubjugável agradeço.

Nas garras do destino e seus estragos,
Sob os golpes que o acaso atira e acerta,
Nunca me lamentei - e ainda trago
Minha cabeça - embora em sangue - ereta.

Além deste oceano de lamúria,
Somente o Horror das trevas se divisa;
Porém o tempo, a consumir-se em fúria,
Não me amedronta, nem me martiriza.

Por ser estreita a fenda - eu não declino,
Nem por pesada a mão que o mundo espalma;
Eu sou o mestre de meu destino;
Eu sou o capitão de minha alma.

- *William Ernest Henley*

RESUMO

As células da crista neural truncal (CNT) migram por diferentes rotas separadas temporalmente e espacialmente. A migração e diferenciação das células da CNT são definidas por microambientes específicos. O microambiente embrionário é capaz de regular a expressão de uma complexa rede de fatores de transcrição que conduzirá a diferenciação dessas células. Recentemente tem sido demonstrado que a co-chaperonina Stil apresenta uma forma solúvel, presente no microambiente embrionário. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que a Stil extracelular é capaz de modular a diferenciação das células da CNT, modulando a expressão de *Sox10* nessas células. Paralelamente, nosso grupo observou que a Stil é amplamente expressa em domínios embrionários relacionados a migração inicial das células da CNT. Esses dados sugerem que a Stil pode ser um importante fator regulatório na diferenciação das células da CNT. Para melhor compreender o efeito de Stil sobre as células da CNT, essas células foram tratadas com Stil, após o estágio de migração. Posteriormente, foi analisado a proliferação celular de progenitores de neurônios simpáticos (Mash1). Essas análises realizadas não apresentaram diferenças significativas, então, em uma segunda etapa foi realizada uma análise da fluorescência total de Mash1, para observar se a Stil atuaria modulando a expressão deste fator de transcrição. Entretanto, também não foi possível encontrar significância estatística. Portanto, foi estabelecido um novo modelo de cultura, onde uma região do tubo neural anterior (15-20 somitos) e posterior (21-24 somitos) foi separada para observar as individualidades de cada região. Inicialmente, foi observado um grande aumento de células gliais em culturas controle providas do tubo neural anterior, em relação ao tubo neural posterior. Esse resultado mostra uma diferença dos estudos, *in vivo*, obtidos até o momento. Não foi observado diferença significativa no número de células gliais e melanócitos, quando tratados com Stil, discordando de trabalhos anteriores do grupo. É importante ressaltar que a diferença nesse caso é o momento do tratamento com Stil, anteriormente feito enquanto as células da CNT migravam, ou seja, na presença do tubo neural. Nesse trabalho, os tratamentos com Stil foram realizados após a migração e remoção do tubo neural. Esses dados sugerem que o efeito do Stil, sobre as células da CNT, seria indireto, provavelmente, atuando via tubo neural sobre progenitores mais indiferenciados da CNT.

Palavras-chave: Biologia Celular, Diferenciação Celular, Stip1

ABSTRACT

Truncal neural crest (TNC) cells migrate through different routes separated temporally and spatially. Migration and differentiation of TNC cells are defined by specific microenvironments. The embryonic microenvironment is able to regulate the expression of a complex network of transcription factors that will lead to the differentiation of these cells. It has recently been shown that the co-chaperonin Stl1 has a soluble form present in the embryonic microenvironment. Previous work from our group has demonstrated that extracellular Stl1 is able to modulate the differentiation of TNC cells by modulating *Sox10* expression. In parallel, our group observed that Stl1 is widely expressed in embryonic domains related to the initial migration of TNC cells. These data suggest that Stl1 may be an important regulatory factor in the differentiation of TNC cells. To better understand the effect of Stl1 on the TNC cells, these cells were treated with Stl1 after the migration stage. Subsequently, cell proliferation and sympathetic neuron progenitors (*Mash1*) were analyzed. These analyzes did not show statistical differences, so in a second step a total fluorescence analysis of *Mash1* was performed to observe if Stl1 would act modulating the expression of this transcription factor. However, it was also not possible to find statistical difference in the results. Therefore, a new model of culture was established, where a region of the anterior (15-20 somites) and posterior (21-24 somites) neural tube was separated to observe the individualities of each region. Initially, it was observed a large increase of glial cells in control cultures from the anterior neural tube when compared to the posterior neural tube. This result shows a difference of the studies, *in vivo*, obtained so far. There was no statistical difference in the number of glial and melanocyte cells when treated with Stl1, disagreeing with previous work from the group. It is important to emphasize that the difference in this case is the moment Stl1 is put in culture, previously done while the TNC cells were migrating, that is, in the presence of the neural tube. In this work, Stl1 treatments were performed after neural crest cells migration and removal of the neural tube. These data suggest that the effect of Stl1 on TNC cells would be indirect, probably, acting via neural tube on more undifferentiated TNC progenitors.

Keywords: Cellular Biology, Cellular Differentiation, Stip1

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Tubo neural com suas respectivas rotas de migração | 28 |
| Figura 2: Abordagem metodológica das culturas e análises realizadas. 37 | |
| Figura 3: Metodologia da cultura de células da CNT de 14-24 s | 39 |
| Figura 4: Representação das regiões truncais de onde foram isolados os segmentos de tubo neural utilizados nas culturas de células da CNT anterior e posterior. | 41 |
| Figura 5: Metodologia das culturas de células da CNT de diferentes níveis anteroposterior. | 42 |
| Figura 6: Células Mash1 ⁺ | 45 |
| Figura 7: Análise da proliferação de células tratadas com Sti1 | 47 |
| Figura 8: Análise de células Mash1 ⁺ | 48 |
| Figura 9: Análise da proliferação das células Mash1 ⁺ | 50 |
| Figura 10: Análise da expressão de total de Mash1 através de imuno-fluorescência | 51 |
| Figura 11: Análise de células gliais e melanócitos do TNA e TNP em grupo controle | 53 |
| Figura 12: Análise do efeito do Sti1 em células gliais e melanócitos do TNA e TNP | 54 |
| Figura 13: Linha temporal das culturas realizadas pela autora e por Oliveira, 2015..... | 56 |
| Figura 14: Escala de migração dos progenitores..... | 58 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Informações dos anticorpos utilizados | 43 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| Bmp | Do inglês, <i>Bone morphogenetic protein</i> (Proteína morfogenética de osso) |
| BrdU | 5-bromo-2'-deoxiuridina |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CF | Conteúdo de fluorescência |
| CN | Crista neural |
| CNC | Crista neural cefálica |
| CNT | Crista neural truncal |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CPCS | Células precursoras de células de Schwann |
| DAPI | 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EE | Extrato de embrião |
| Egf | Do inglês, <i>Epidermal growth factor</i> (Fator de crescimento epidermal) |
| Egr2 | Do inglês, <i>Early growth response2</i> (Resposta de crescimento precoce 2) |
| Et3 | Endotelina 3 |
| Fgf | Do inglês, <i>Fibroblast growth factor</i> (Fator de crescimento de fibroblasto) |
| FoxD3 | Do inglês, <i>Forkhead box D3</i> |
| G | Gravidade |
| GAM | Do inglês, <i>Goat anti mouse</i> (Cabra anti camundongo) |
| GAR | Do inglês, <i>Goat anti rat</i> (Cabra anti rato) |

| | |
|------------------|---|
| Ggf | Do inglês, <i>Glial growth factor</i> (Fator de crescimento glial) |
| HCl | Ácido Clorídrico |
| HH | Estágio de desenvolvimento; Hamburger e Hamilton |
| HNK1 | Do inglês, <i>Human natural killer1</i> (Matador natural humano1) |
| HSP | Do inglês, <i>Heat shock protein</i> (Proteína de choque térmico) |
| IgG | Imunoglobulina G |
| M | Molar |
| Mash1 | Do inglês, <i>Achaete-scute family bHLH transcription factor1</i> |
| MEM | Do inglês, <i>modified minimum essential medium</i> |
| mm | Milímetros |
| Nf200 | Neurofilamento 200 |
| NY | Nova York |
| Pax3 | Do inglês, <i>Paired box3</i> |
| PBS | Salina tamponada de fosfato |
| pH | Escala de Potencial de Hidrogênio |
| PrP ^C | Proteína príon celular |
| s | Somitos |
| ss | Do inglês, <i>somite stage</i> (Estágio do somito) |
| SBF | Soro fetal bovino |
| Shh | Sonic hedgehog |
| Slug/Snail | Do inglês, <i>Zinc-finger protein SNAIL</i> |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| Sox | Do inglês, <i>Sry-related HMG box</i> |

| | |
|----------------|---|
| Sti1 | Do inglês, <i>Stress-inducible protein1</i> (Proteína induzida por estresse do tipo I) |
| T ₃ | Triiodotironina |
| TN | Tubo neural |
| TNC | Do inglês, <i>Truncal neural crest</i> (Crista neural truncal) |
| TNA | Tubo neural anterior |
| TNP | Tubo neural posterior |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |
| UR | Umidade relativa |
| USA | Estados Unidos da América |
| Wnt | Do inglês, <i>Wingless-int</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 27 |
| 1.1 | A CRISTA NEURAL E SUA FORMAÇÃO..... | 27 |
| 1.2 | MULTIPOTENCIALIDADES DA CN | 29 |
| 1.3 | DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN | 30 |
| 1.4 | FOSFOPROTEINA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1.. | 31 |
| 2 | JUSTIFICATIVA..... | 33 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 35 |
| | Objetivo geral | 35 |
| | Objetivos específicos | 35 |
| 4 | METODOLOGIA | 37 |
| 4.1 | ABORDAGEM METODOLÓGICA | 37 |
| 4.2 | OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNA | 38 |
| 4.3 | CULTURA DE CÉLULAS DA CNT | 38 |
| 4.3.1 | Cultura de células da CNT | 38 |
| 4.3.2 | Cultura de células da CNT de diferentes níveis anteroposterior | 40 |
| 4.4 | IMUNOCITOQUÍMICA | 42 |
| 4.5 | ANÁLISE FENOTÓPICA E QUANTIFICAÇÃO..... | 43 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 44 |
| 5 | RESULTADOS..... | 45 |
| 5.1 | PADRONIZAÇÃO DO ANTICORPO α -MASH1 | 45 |
| 5.2 | EXPERIMENTOS REALIZADOS COM CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE TUBOS NEURAI ADJACENTES AOS SOMITOS 14-24 S (10 ÚLTIMOS SOMITOS FORMADOS)..... | 46 |
| 5.2.1 | Sti1 não altera a proliferação das células da CNT | 46 |
| 5.2.2 | Sti1 não altera o número de células Mash1 ⁺ | 48 |
| 5.2.3 | O Sti1 não afeta a proliferação de células Mash1 ⁺ | 49 |

5.2.4 St1 não afeta os níveis de expressão de Mash1⁺ das células da CN 50

5.3 CULTURAS DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL COM TUBOS NEURAIIS DE DIFERENTES NÍVEIS ÂNTEROPOSTERIOR 51

5.3.1 Células da CNT, derivadas do TNA e TNP não apresentam diferenças entre si quanto à diferenciação de melanócitos e células gliais 52

5.3.2 O St1 não altera o número de células gliais e melanócitos derivados de diferentes níveis axiais do embrião. 53

5.3.3 Culturas de diferentes níveis ânteroposterior não apresentam neurônios..... 54

6 DISCUSSÃO..... 55

7 CONCLUSÕES..... 61

8 PERSPECTIVAS 63

9 REFERÊNCIAS..... 65

1 INTRODUÇÃO

1.1 A CRISTA NEURAL E SUA FORMAÇÃO

Em 1868 Wilhelm His observou uma população transitória de células localizada ao longo do embrião, paralela à região dorsal do tubo neural. Entretanto apenas em 1879 Arthur Milnes Marshall denominou esta população de células como Crista Neural (CN) (HALL, 2009). Após 150 anos, sabe-se que a CN é formada por uma população de células multipotentes que são responsáveis pela formação de diferentes estruturas embrionárias e pode dar origem a uma grande variedade de tipos de células (GILBERT, 2014).

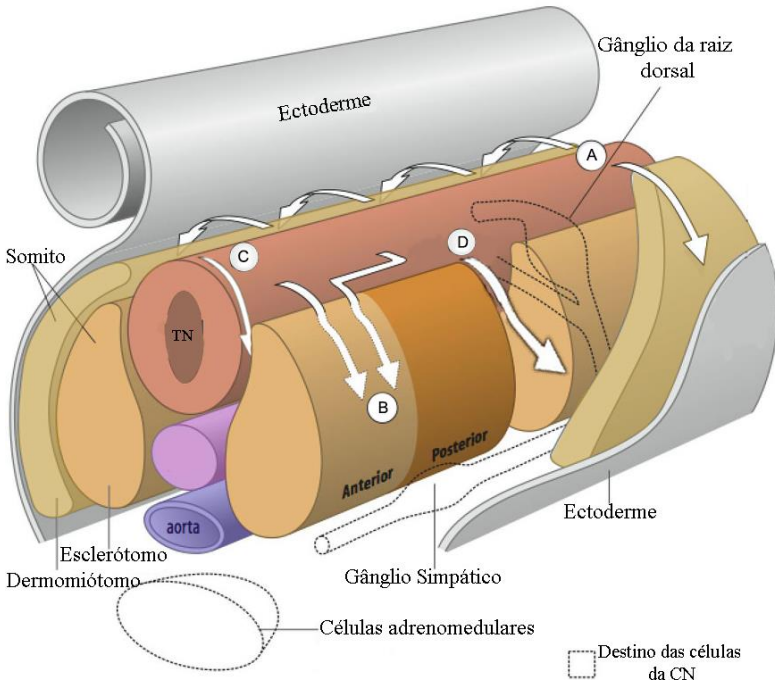
Durante o processo de neurulação, o neuroepitélio irá invaginar, dobrando-se para formar o sulco neural e após, o tubo neural (TN). Após este processo, nas bordas dorsais da placa neural, as células da CN, sob indução de uma combinação específica de fatores, sofrerão transição epitélio-mesenquimal e migrará por rotas definidas para, praticamente, todas as regiões do corpo dos vertebrados. As células da CN migram ao longo de todo eixo anteroposterior do embrião, podendo ser dividida em dois grupos: I) células da crista neural cefálica (CNC), que migram a partir da porção mais anterior do tubo neural e dão origem aos derivados neurais, melanócitos e derivados mesenquimais, como osso, cartilagem, musculatura lisa, adipócitos, entre outros; II) células da crista neural truncal (CNT), essas migram a partir da borda dorsal do restante do tubo neural. A CNT dá origem aos melanócitos, neurônios, células gliais do sistema nervoso periférico (SNP) e células adrenomedulares (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999, HALL, 2009).

As células da CNC migram entre a ectoderme cefálica e o tubo neural, além disso, colonizam os arcos branquiais, formando o seu mesênquima. (KÖNTGES; LUMSDEN, 1996; CREUZET; COULY; DOUARIN, 2005). As células da CNC que migram a partir dos últimos rombômeros, seguem a rota dorso-ventral, formando o sistema nervoso entérico e o trato cardíaco (LE DOUARIN; TEILLET, 1973; LE LIÈVRE; LE DOUARIN, 1975; ETCHEVERS, 2011).

As células da CNT migram por diferentes rotas, inicialmente elas seguem paralelamente ao tubo neural, dando origem aos gânglios simpáticos e células adrenomedulares (Figura 1C). Após a separação do somito em esclerótomo e dermomiótomo, as células da CN migram pela rota dorso-ventro-lateral, entre o esclerótomo e o dermomiótomo pela porção anterior de cada somito. Esse grupo de células dará origem aos gânglios da raiz dorsal (Figura 1B). O último grupo de células da CNT a

migrar, segue pela rota dorso-lateral, adjacentes a ectoderme, originando os melanócitos (Figura 1C) (TEILLET; KALCHEIM; LE DOUARIN, 1987). As células da CNT migrarão por essas rotas, separadas temporalmente e espacialmente. Estas rotas são definidas por microambientes específicos que irão interagir com as células da CN e determinarão seu fenótipo (GAMMILL; ROFFERS-AGARWAL, 2010). As diferentes moléculas encontradas durante a migração, em cada uma das rotas, modulará uma rede de fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação destas (SIMOES-COSTA; BRONNER, 2015).

Figura 1: Tubo neural com suas respectivas rotas de migração



Fonte: Adaptado de Dr. Brian E. Staveley, Memorial University of Newfoundland.

Nota: Tubo neural com as principais rotas de migração: (A) Rota dorso-lateral, onde as células migrarão entre o dermatomiótomo e a ectoderme e darão origem aos melanócitos. (B) Rota dorso-ventro-lateral, onde as células migrarão entre o dermatomiótomo e o esclerótomo e darão origem ao GRD. Já na rota dorso-ventral (C) as células migrarão entre o tubo neural (TN) e o esclerótomo e darão

origem aos gânglios simpáticos e células adrenomedulares. (D) Rota dos vasos intersomíticos, onde as células migrarão ventrealmente entre um somito e outro, onde estão localizados os vasos intersomíticos.

1.2 MULTIPOTENCIALIDADES DA CN

Uma das mais importantes questões sobre a CN e seu desenvolvimento é em relação a sua multipotencialidade. Os diferentes tipos celulares derivados da CN teriam uma origem em comum, ou seriam derivados de progenitores distintos?

Bronner-Fraser e Fraser (1988) demonstraram por meio de experimentos que as células da CNT são multipotente. Através de micro-injeções com corante na parte dorsal do tubo neural de embriões galinhas, foi possível acompanhar as células que emigraram e assim, observar a diferenciação destas em até 4 fenótipos distintos. Possibilitando observar que 60% das células da CNT coradas deram origem a diferentes fenótipos e colonizaram diferentes locais do embrião. Contudo, os resultados não descartam a existência de células pré-determinadas na CN (BRONNER-FRASER; FRASER, 1988).

Calloni e colaboradores, utilizando ensaios clonais, descreveram a existência de diversos progenitores da CNC com múltiplas potencialidades, capazes de dar origem a condrócitos, neurônios, células gliais, melanócitos, miofibroblastos e osteócitos, *in vitro* (CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Em 1999, o grupo de Le Douarin marcou individualmente células através de proteínas inseridas com vetores retrovirais. Isso garantiu identificar as células multipotentes da CN e suas células clones. Esse experimento mostrou que células progenitoras são capazes de originar diferentes fenótipos e pode coexistir com células que possuem um destino restrito (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; SOMMER, 2001). Porém, o número de células multipotentes decai com a idade do embrião (SOMMER, 2006).

Mais recentemente, em estudos com embriões murinos, Baggiolini utilizando a técnica '*confetti*', que permite marcar com até 10 cores distintas as células, rastreá-las após emigrarem e marcar toda sua prole. Dessa forma demonstrou a multipotencialidade das células CN, *in vivo*, pois identificou progenitores capazes de formar neurônios, células gliais e melanócitos (BAGGIOLINI *et al.*, 2015).

Entretanto, Krispin *et al.*, realizando experimentos *in vivo* com embriões de galinha, propõe que as células da CNT já assumem uma identidade pré determinada antes de emigrarem do TN, e que estas

células dão origem a um único fenótipo em seu destino. Ou seja, a célula da CN irá migrar por uma rota específica onde irá diferenciar em um fenótipo pré-determinado. Contudo, há ainda a ressalva que existam células progenitoras que sejam multipotentes (KRISPIN *et al.*, 2010).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS DA CN

No microambiente embrionário existem inúmeros fatores solúveis que irão influenciar na diferenciação celular (MURPHY *et al.*, 1994). Os diferentes gradientes de Bmps (proteínas morfogenéticas do osso) induzem a expressão de fatores de transcrição para a formação da placa neural e conjuntamente com Wnts (proteínas *wingless-Int*) na formação da crista neural (MARCHANT *et al.*, 1998). Ao inibir o Bmp, o Noggin induz a diferenciação de neurônios simpáticos, assim como Sonic hedgehog que estimula aos fenótipos neuronais e mesenquimais em células da CN (CALLONI *et al.*, 2007). Já a família do Fgf (Fator de crescimento de fibroblasto) é conhecida por induzir a proliferação e migração das células da CN (MURPHY *et al.*, 1994). Assim como o Egf (Fator de crescimento epidermal), que também estimula as células da CN a diferenciarem em neurônios e melanócitos (GARCEZ *et al.*, 2009) e o fator de crescimento glial (Ggf) que promove a diferenciação de células gliais (SHAH; ANDERSON, 1997). Existem algumas proteínas citoplasmáticas, como por exemplo, a Proteína Induzida por Estresse do Tipo 1 (Sti1) que pode se portar como fator solúvel em alguns casos e apresentar funções semelhantes a fatores de crescimento (LIMA *et al.*, 2007). Dados do nosso grupo demonstraram que Sti1 é expressa pelas células da CN *in vitro* (SCHMITT, 2009) e *in vivo* (Dados não publicados). Além disso, Sti1 é expressa nos gânglios da raiz dorsal e gânglios simpáticos em desenvolvimento (Dados do grupo não publicados). Os fatores solúveis, presentes no microambiente embrionário, são capazes de exercer uma regulação intrínseca na expressão dos fatores de transcrição, modulando dessa forma uma complexa rede de genes que determinará a diferenciação celular.

Após a indução das células da CN, elas passam a expressar um conjunto de fatores de transcrição chamados de “especificadores da crista neural”. Esses fatores de transcrição levarão as células a sofrerem uma transição epitélio-mesenquimal e iniciarem o processo de migração (GILBERT, 2014; TRAINOR, 2014). Dentre esses fatores de transcrição, o *Slug* (*Zinc-finger protein SNAI1*) é o mais estudado, ele é capaz de coordenar as junções celulares e moléculas de adesão, como as N-caderinas induzindo as células da CN a começarem a migração

(SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Estudos mostram que os fatores de transcrição membros da família *Sox* (*Sry-related HMG box*) desempenham um importante papel no desenvolvimento da CN. O *Sox10*, membro mais importante dessa família para a diferenciação inicial das células da CN, coordena importantes funções de regulação e diferenciação fenotípica das células da CN, como por exemplo, a diferenciação de células gliais (PARATORE *et al.*, 2001; AOKI *et al.*, 2003; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008). Quando há perda de função do *Sox10*, há defeitos na mielinização das células de Schwann e na diferenciação de melanócitos (PARATORE *et al.*, 2001). O balanço na expressão de *Sox10*, juntamente com *FoxD3* (*Forkhead box D3*) e *Pax3* (*Paired box3*), determinam o início da expressão dos fatores de transcrição especificadores da CN, como o *Mash1* (*Achaete-scute family bHLH transcription factor1*), que iniciará o programa molecular de diferenciação dos neurônios simpáticos, *Neurogenina1* que levará à diferenciação de neurônios sensoriais, o *Egr2* (*Early growth response2*), que atuará como um dos principais reguladores na expressão de células gliais e o *MITF* responsável por tornar as células antes indiferenciadas em melanócitos (MEULEMANS; BRONNER-FRASER, 2004; SAUKA-SPENGLER; BRONNER-FRASER, 2008; STOLT; WEGNER, 2016).

1.4 FOSFOPROTEÍNA INDUZIDA POR ESTRESSE DO TIPO 1

A fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 é da família das co-chaperoninas, inicialmente descrita como uma proteína de choque térmico associada ao macrocomplexo HSP70/90 (ODUNUGA *et al.*, 2004). Este macromplexo participa de vários processos celulares, como replicação viral, transdução de sinal, translocação e envelopamento de proteínas (MARTINS *et al.*, 1997; JOHNSON *et al.*, 1998; BHARADWAJ; ALI; OVSENEK, 1999; ARBEITMAN; HOGNESS, 2000; HU *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002). Por não possuir peptídeo sinal ou domínio transmembrana, o *Sti1* já foi considerado uma proteína citoplasmática (LÄSSLE *et al.*, 1997). Entretanto, estudos indicam que o *Sti1* pode ser deslocado até a membrana celular e ser secretado para fora célula (EUSTACE & JAY, 2004; WANG *et al.*, 2010). As funções associadas a *Sti1* extracelular ainda são pouco estudadas. Sabe-se que *Sti1* extracelular liga-se a proteína príon celular (PrP^{C}) na superfície de algumas células, entre elas neurônios, induzindo a neuroproteção (ROFFE *et al.*, 2010; ZANATA *et al.*, 2002) e a neuritogênese (LOPES, 2005).

No SNP, o Stl1 é expresso nos gânglios de raiz dorsal e gânglios simpáticos (HAJJ *et al.*, 2009). Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstram, *in vitro*, que Stl1 modula a diferenciação das células da CNT aumentando em 5 vezes o número de neurônios, 2 vezes o número de melanócitos, em detrimento de células gliais (SCHMITT, 2009). Oliveira, 2015 demonstrou que Stl1 é capaz de modular a expressão de Sox10 em células da CNT (OLIVEIRA, 2015). Em conjunto, estes dados sugerem que o Stl1 pode ser um importante fator regulatório na diferenciação das células da CNT. No entanto, são necessário estudos mais elaborados correlacionando aos efeitos do Stl-1 sobre a expressão dos fatores de transcrição que controlam a diferenciação inicial das células da CN, como Sox10, FoxD3, Mash1, Nrg1, Islet1 e Mitf com a diferenciação dessas células para tipos celulares específicos.

2 JUSTIFICATIVA

Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram que Stl1 é capaz de modular a expressão de Sox10, um dos principais fatores de transcrição que controla a diferenciação inicial das células da CNT *in vitro* (OLIVEIRA, 2015) e em sistema de cultivo *ex vivo* (CUNHA, 2017). O aumento na expressão de Sox10, ao longo do processo de diferenciação das células da CN, está intimamente relacionado à diferenciação de neurônios, células gliais e melanócitos, bem como na manutenção do estado indiferenciado, dependendo do contexto molecular (KIM *et al.*, 2004).

O Stl1 é uma proteína com funções muito pouco conhecidas, principalmente os seus efeitos extracelulares. Esses achados iniciais do nosso grupo, relacionando Stl1 à diferenciação das células da CNT, são um forte indicativo que essa proteína pode ter um papel importante na biologia das células da CNT. Conhecer os demais genes relacionados a diferenciação das células da CNT, que são modulados por Stl1, pode representar um importante passo na compreensão dos mecanismos de diferenciação das células da CNT.

A identificação de Stl1 como um novo fator solúvel, capaz de modular os mecanismos moleculares e regulatórios da CNT, poderia, futuramente, ajudar no tratamento das neurocristopatias. Como podemos citar a síndrome de Waardenburg, que por um erro no gene *Sox10*, causa surdez, distúrbio na pigmentação dos olhos, pele e cabelos e desmielinização em alguns casos. (WENZHI *et al.*, 2015).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar o efeito extracelular da Proteína Induzida por Estresse tipo 1 (Sti1) sobre a diferenciação dos derivados da Crista Neural Truncal.

Objetivos específicos

- Analisar a influência do Sti1 sobre proliferação das células da CNT;
- Verificar a influência do Sti1 sobre a via de diferenciação de neurônios simpáticos;
- Determinar o perfil de diferenciação das células da CNT isoladas de dois diferentes níveis axiais, ao longo do eixo anteroposterior do embrião;

4 METODOLOGIA

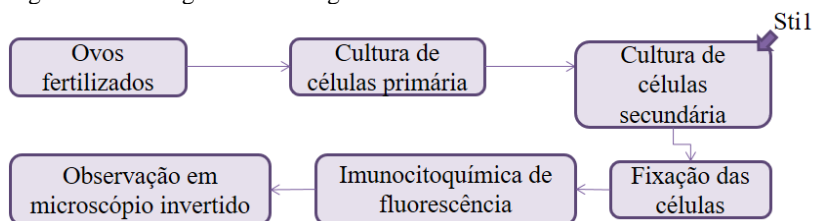
4.1 ABORDAGEM METODOLÓGICA

Para analisarmos a influência do Stl1 nas células da CN, foram realizadas dois modelos de cultura de células da CN de codornas (ZILLER *et al.*, 1983; ETCHEVERS, 2011; TRENTIN; GARCEZ; BRESSAN, 2016): 1) O tubo neural adjacente aos 10 últimos somitos formados (aproximadamente entre o 14-24 s, num embrião 24 ss) foi isolado dos demais tecidos embrionários e utilizado para cultura de células da CNT; 2) O mesmo segmento do tubo neural, utilizado anteriormente, foi segmentado em tubo neural anterior (adjacente aos somitos 15-20 s) e tubo neural posterior (21-24 s). Esses segmentos foram cultivados para isolamento das células da CNT.

Para a realização da cultura secundária as células da CNT que migraram pela superfície de cultivo (cultivo primário) foram removidas e cultivadas em baixa densidade com Stl1 ou mantidas em situação controle por tempo específico para cada experimento (cultivo secundário).

A análise fenotípica foi realizada através de observação a campo claro para quantificar melanócitos e ensaio imunocitoquímico, usando anticorpos como α -Mash1, α -HNK1. Esses anticorpos reconhecem progenitores de neurônios simpáticos e células gliais, respectivamente.

Figura 2: Abordagem metodológica das culturas e análises realizadas



Fonte: Produzida pela autora (2017).

Nota: Fluxograma demonstrando como foram realizados os experimentos descritos abaixo.

4.2 OBTENÇÃO E INCUBAÇÃO DOS OVOS DE CODORNA

Ovos de codorna (*Coturnix japonica*) adquiridos da Granja Dumuty (localizada na cidade de Rio do Sul, Santa Catarina) foram incubados durante aproximadamente 48 horas em estufa a 38 °C em 65 % de Umidade Relativa (UR), para obter embriões nos estágios de até somitos (24 ss), correspondente aos estágios 15 HH (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). As técnicas utilizadas nesse projeto foram aprovadas pelo Comitê de Ética com o Uso de Animais – CEUA da UFSC PP00787. Atualmente esses mesmos procedimentos encontram-se submetidos ao CEUA para renovação, registrados sob o protocolo número 6016021017.

4.3 CULTURA DE CÉLULAS DA CNT

A metodologia usada para a cultura de células de embriões foram realizadas de acordo com protocolo descrito por Etchevers, 2011 e Trentin; Garcez e Bressan, 2016, utilizando o meio de cultivo descrito por Ziller e colaboradores, 1983.

4.3.1 Cultura de células da CNT

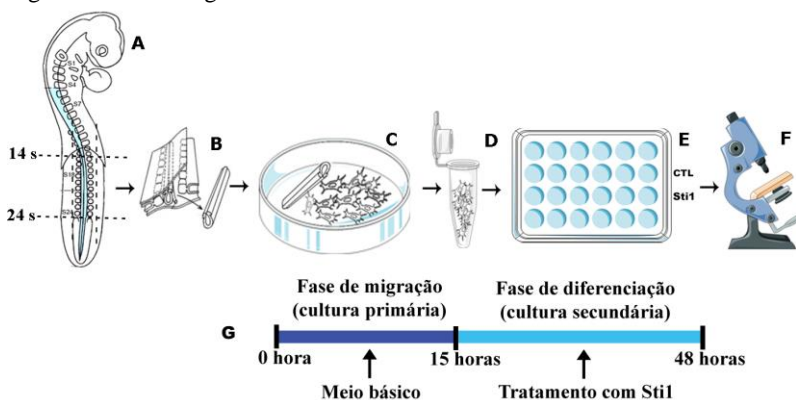
Os embriões de codorna no estágio de 15 HH (24 ss) foram removidos do ovo e transferidos para uma solução de PBS (solução salina tamponada de fosfato, pH 7,4). Em seguida, a região truncal entre os somitos 14 e 24 (14-24 s; Figura 3A) foi dissecada e colocada em solução de pancreatina (6,25 g/l; Sigma) para separação dos tecidos embrionários. Dessa forma, com o auxílio de agulhas entomológicas de tungstênio o tubo neural foi isolado sob observação em microscópio estereoscópico (Olympus SZ61) (Figura 3B).

Os tubos neurais isolados foram cultivados em placas de 35 mm de diâmetro (Corning, NY, USA) em 800 µl de meio de cultura *α-modified minimum essential medium* (α-MEM; Gibco-BRL, Grand Island, NY), 10 % de soro fetal bovino (SBF; Cultlab), 2 % de extrato de embrião de galinha (EE), penicilina (200 U/ml; Gibco) e estreptomicina (10µg/ml; Gibco) (meio básico). Em seguida, colocados em estufa a 37 °C, 5 % de CO₂ e 65 % de UR (Figura 3C). Em cada experimento foi utilizado, em média, 6 tubos neurais isolados, por condição de cultivo.

Após 15 horas de cultivo, os tubos neurais foram cuidadosamente removidos. As células da crista neural que migraram permaneceram aderidas à placa de cultivo. Elas foram deslocadas com solução de Tripsina com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 0,05% (Gibco), em seguida centrifugadas a 352 G por 5 minutos e suspensas em meio básico de cultivo (Figura 3D). As células foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer e diluídas a uma densidade de 30 células/ μl . Em placas de cultivo de 24 poços (Corning, NY, USA), previamente revestidas com colágeno I. As células foram plaqueadas em gotas de 30 μl com 900 células por gota. Após uma hora e meia (tempo necessário para a adesão das células) foi adicionado 270 μl de meio básico (grupo controle) e meio básico com adição de Stl1 a 10 ng/ml (grupo tratado) (Figura 3E, 3G)

As células em cultivo foram mantidas a 38 °C em atmosfera com 5 % de CO_2 e 65 % de umidade, durante mais 32 horas. Após esse período, foi adicionado 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; Invitrogen) ao meio de cultura de cada poço, para uma concentração final de 10 μM . As células, após a adição de BrdU, voltaram a ser armazenadas em estufa a 37 °C, 5 % de CO_2 e 65% de UR. Após uma hora, as células foram fixadas com formaldeído (Vetec) 4%, diluído em PBS, durante 40 minutos em temperatura ambiente e armazenadas em PBS com 0,5% de formaldeído.

Figura 3: Metodologia da cultura de células da CNT de 14-24 s



Fonte: Adaptada a partir de DUPIN, 2014; LE DOUARIN, 2004 e <http://servier.com.br/content/banco-de-imagens>.

Nota: (A) Representação de um embrião inteiro no estágio do desenvolvimento no qual o isolamento do tubo neural é feito para cultivo de células da CNT. A região interna ao traçado representa a região do embrião que foi isolada. (B)

Segmento de embrião após ser colocado na presença de pancreatina para isolar o tubo neural. (C) Após 15 horas de cultivo, as células da CNT migraram a partir do tubo neural. (D) Células da CNT suspensas e centrifugadas para serem plaqueadas. (E) Placa com 900 células por poço, onde ficaram 33 horas em estufa. (F) Análise dos fenótipos a partir de imunocitoquímica de fluorescência. (G) Linha temporal mostrando o tratamento utilizado.

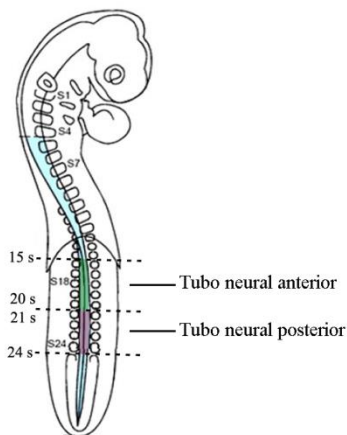
4.3.2 Cultura de células da CNT de diferentes níveis anteroposterior

As células da CNT, *in vivo*, migram durante um período de tempo relativamente grande. As primeiras células da CNT a migrarem formarão derivados simpáticos, seguido das células que formarão derivados neurais sensoriais e melanócitos (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; HALL, 2009). Em aves, o início da migração das células da CNT coincide com a segmentação da mesoderme paraxial (formação do somito). Dessa forma, as células da CNT que migram a partir do TN mais próximo do último somito formado estão em início de migração. Já as células da CNT que migram a partir do tubo neural adjacente ao 14º somito encontram-se em fase final de migração. Sendo assim, para verificar um possível efeito diferencial de Stl-1 sobre as células da CNT em início de migração e em migração mais tardia, foi realizada uma série de experimentos com duas regiões distintas do tubo neural: região posterior - tubo neural adjacente aos quatro últimos somitos formados (TNP 21-24 s); Região anterior - tubo neural adjacente aos cinco próximos somitos formados (TNA 15-20 s) (Figura 5). Os procedimentos de isolamento e cultivo do tubo neural foram realizados conforme descrito em 2.2.1.

Em média, 8 tubos neurais (8 anteriores e 8 posteriores) foram plaqueados em cada experimento, utilizando os mesmos grupos controle e tratado com Stl-1 em condição de incubação supracitados (Figura 3D e 3E).

As células em cultivo foram mantidas a 38 °C em atmosfera com 5 % de CO₂ e 65 % de umidade, durante mais 33 horas. Então, foi retirado seus respectivos meios de cultivo (controle e tratado) e adicionado meio de cultivo controle em todos os cultivos celulares. Após 72 horas as células foram fixadas com formaldeído (Vetec) 4% durante 40 minutos em temperatura ambiente e armazenadas em PBS com 0,5% de formaldeído.

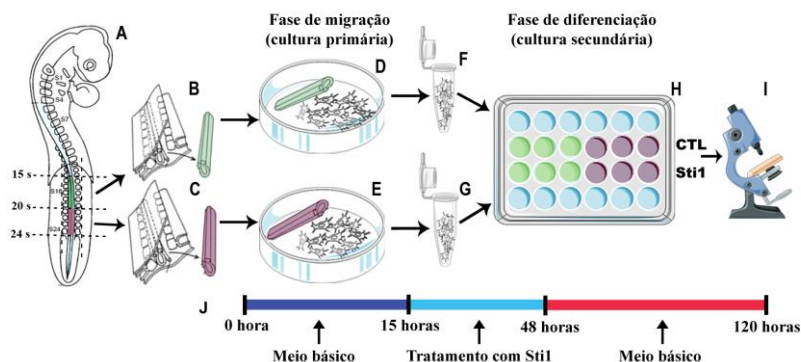
Figura 4: Representação das regiões truncais de onde foram isolados os segmentos de tubo neural utilizados nas culturas de células da CNT anterior e posterior.



Fonte: Adaptado de LE DOUARIN, 2004.

Nota: Representação de um embrião inteiro no estágio de desenvolvimento utilizado, 24 ss. Em verde está delimitando a região correspondente aos 14-20 s adjacentes ao tubo neural anterior (TNA). Em vermelho está representando o tubo neural posterior (TNP), onde foi isolado na região dos 21-24 s.

Figura 5: Metodologia das culturas de células da CNT de diferentes níveis anteroposterior.



Fonte: Adaptada a partir de DUPIN, 2014; LE DOUARIN, 2004 e <http://servier.com.br/content/banco-de-imagens>.

Nota: (A) Representação esquemática de um embrião inteiro, onde em verde está delimitado o tubo neural anterior (15-20 s) e em rosa o tubo neural posterior (21-24 s) utilizados para isolamento das células da CNT. (B e C) Tubos neurais anterior e posterior, respectivamente, isolados após permanecerem em pancreatina. (D e E) Células da CNT após 15 horas de migração. (F e G) Células suspensas e contadas. (H) Células plaqueadas em gotas em uma densidade de 900 células por poço divididas em parte anterior em verde e posterior em vermelho. (I) Análise dos fenótipos a partir de imunocitoquímica. (J) Linha temporal mostrando os tratamentos utilizados durante os cultivos celulares.

4.4 IMUNOCITOQUÍMICA

As células da CNT isoladas a partir de tubos neurais adjacente aos somitos 14-24 foram fixadas e permeabilizadas durante 30 minutos em temperatura ambiente com solução de PBS com 0,5% de Triton X-100. Em seguida, foi adicionado solução de ácido clorídrico (HCl; Merck), a 2N e lavado 2 vezes por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado tampão borato por 15 minutos, após foram realizadas quatro lavagens com PBS com 0,05% de Tween 20 (Sigma) por 5 minutos cada. Foi adicionado os anticorpos específicos α -Mash1 (1:1000; Abcam AB74065) conjuntamente com α -BrdU (1:500; Abcam AB6326). Os anticorpos foram incubados *overnight* a uma temperatura de 4 °C. No dia posterior, as células foram lavadas quatro vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) por 5 minutos e

subsequentemente incubadas por 1 hora (temperatura ambiente) com os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos. Para marcar células que expressaram Mash1 foi usado Alexa Fluor® 594 IgG - *Goat anti mouse* (GAM; 1:1000; Invitrogen A11005) e para o ensaio de proliferação foi usado Alexa Fluor® 488 IgG - *Goat anti rat* (GAR; 1:1000 Invitrogen A11006). Após mais três lavagens as células foram incubadas durante 5 minutos com o corante fluorescente nuclear 4,6-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI; 1 µg/ml; Sigma) e foram observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX 83).

Já para as culturas de tubos neurais de diferentes níveis anteroposterior, as células fixadas foram permeabilizadas durante 30 minutos em temperatura ambiente com solução de PBS-Triton X-100 a 0,5% com 10% de SBF. Em seguida foi adicionado o anticorpo: a) α -NF200 (1:80; Sigma N4142) em uma solução contendo PBS com 0,05% de Tween 20 com 10% de SBF ou b) α -HINK1 (Hybridoma Bank; AB2314644) e incubado *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 repetidamente e subsequentemente incubados os anticorpos secundários conjugados a fluorocromos Alexa Fluor® 488 IgG - GAM (Invitrogen A11005). Após, as células foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e incubadas durante 5 minutos com DAPI e foram observadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus IX 83).

Tabela 1: Informações dos anticorpos utilizados

| Anticorpo Primário | Concentração e isotipo | Anticorpo secundário | Concentração e isotipo |
|---------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------|
| α -BrdU AB6326 | 1: 500; IgG - GAR | Alexa Fluor® 488 | 1:1000; IgG – GAR A11006 |
| α -Mash1 AB74065 | 1:1000; IgG - GAM | Alexa Fluor® 594 | 1:1000; IgG – GAM A11005 |
| α -HINK1 AB2314644 | Hibridoma - GAM | Alexa Fluor® 488 | 1:2000; IgG – GAM A11005 |
| α -NF200 N4142 | 1:80; IgG - GAM | Alexa Fluor® 488 | 1:2000; IgG – GAM A11005 |

Fonte: Produzida pela autora (2017)

4.5 ANÁLISE FENOTÓPICA E QUANTIFICAÇÃO

As células foram observadas em microscópio de fluorescência invertido (Olympus IX83) e fotografadas com sistema de captura de imagem (Olympus DP73). Para cada cultura da CNT isoladas a partir de tubos neurais adjacentes aos somitos 14-24 foram fotografados cerca de

6 campos sequenciais para cada poço de cada experimento ($n=4$). As contagens de células totais assim como os demais fenótipos foram realizadas através da análise de fluorescência pelo ImageJ®.

Para a quantificação do conteúdo de fluorescência (CF) foram selecionadas todas as células através de “*Color Threshold*” seguido de “*Measure*”, onde obtivemos a área total de todas as células e a média da fluorescência. Após, foi multiplicada a área total pela média da fluorescência, que consequentemente foi obtido a CF.

Para a análise das culturas de células de tubos neurais de diferentes níveis anteroposterior, foram fotografadas cerca de 6 campos por poço de cada experimento ($n=5$) e analisadas através do programa ImageJ®. As imagens das células totais foram analisadas através da marcação nucleica com DAPI e sobrepostas às imagens que expressaram os outros fenótipos (glia e melanócitos). Assim foi possível obter a quantidade de células HNK1⁺ e melanócitos. Cada resultado foi dividido pelo número total de células respectivas de cada poço, gerando uma normalização.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos com a expressão de Mash1, Nf200, HNK1 e melanócitos foram analisados utilizando o teste t de *Student*, assim como os valores de células que migraram por tubo e o número total de células que incorporaram BrdU em cada população. Foram consideradas diferenças estatísticas quando $p<0,05$. Essas análises foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism®.

5 RESULTADOS

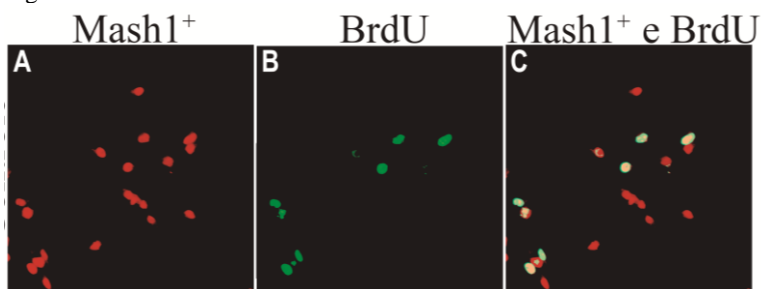
5.1 PADRONIZAÇÃO DO ANTICORPO α -MASH1

O anticorpo α -Mash1 (Abcam AB74065) utilizado não apresenta indicação de uso, pelo fabricante, para células de codorna ou galinha. Sendo assim, para validar e padronizar concentração de uso foram utilizadas as seguintes diluições 1:250, 1:500 e 1:1000. De acordo com o protocolo desenvolvido pela Abcam, a indicação é para que seja feita uma diluição de 1:200.

Como foi utilizado este anticorpo conjuntamente com o anticorpo α -BrdU, onde este último requer um tratamento prévio com HCl, foi testado as mesmas concentração em grupos previamente tratados com HCl e grupos onde não houveram tratamento com ácido.

Como observado na figura 7, a melhor diluição foi de 1:1000, conjuntamente com o anticorpo Alexa Fluor® 594, com diluição de 1:2000. Nessas concentrações as marcações foram restritas ao núcleo das células como esperado. Concentrações inferiores demonstraram marcações inespecíficas.

Figura 6: Células Mash1⁺



Fonte: Produzida pela autora (2017)

Nota: Imagem com células marcadas α -Mash1 em uma diluição de 1:1000 conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor® 594. (A) Imagem com células marcadas em vermelho com α -Mash. (B) Imagem de células marcadas com α -BrdU. (C) Sobreposição de imagens de células que proliferaram e expressaram BrdU. Aumento de 40x.

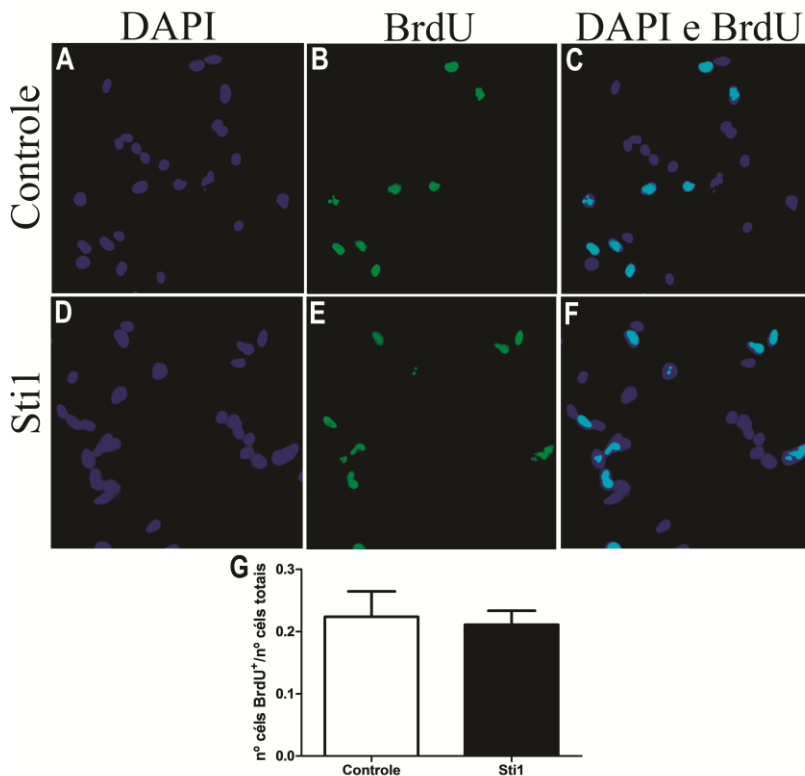
5.2 EXPERIMENTOS REALIZADOS COM CÉLULAS DA CRISTA NEURAL TRUNCAL DE TUBOS NEURAIIS ADJACENTES AOS SOMITOS 14-24 S (10 ÚLTIMOS SOMITOS FORMADOS).

5.2.1 Stl1 não altera a proliferação das células da CNT

O efeito do Stl1 sobre a proliferação das células da CNT foi analisado através de ensaios de incorporação de BrdU.

Devido a alta taxa de proliferação das células da CNT, previamente foi selecionado um período de incorporação de BrdU de apenas uma hora (Figuras 8A, 8B, 8C, 8D, 8E e 8F). O tratamento com Stl1 apresentou uma diminuição de 5,68% na proliferação das células da CN, entretanto essa diferença não foi significativa, quando comparados os grupos controle e tratado com Stl1 (Figura 8E). As células da CNT em cultivo formam uma população heterogênea, composta por progenitores de diversas potencialidades. Sendo assim, o Stl1 poderia alterar a proliferação de apenas um ou poucos grupos de progenitores. Para verificar tal hipótese, duplas marcações entre marcadores de progenitores e BrdU podem ser realizadas.

Figura 7: Análise da proliferação de células tratadas com Stt1



Fonte: Produzida pela autora (2017).

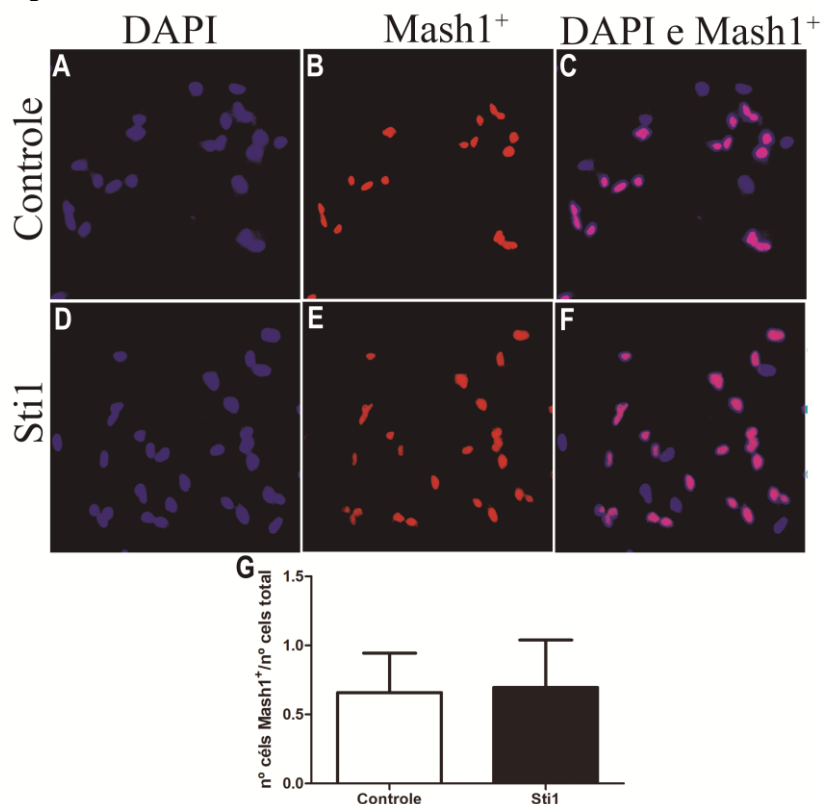
Nota: Imagem mostrando a incorporação de BrdU na última hora de cultivo em situação controle e tratado com Stt1. Em (A) imagem de todos os núcleos celulares marcados com DAPI em situação controle. (B) Incorporação de BrdU nas células da CNT em condição controle. (C) Sobreposição de imagens de células totais e células que proliferaram em condição controle. (D) Células totais marcadas com DAPI com tratamento de Stt1. (E) Células da CNT que foram tratadas com Stt1 que obtiveram incorporação de BrdU. (F) Sobreposição de imagem de células totais e células que proliferaram na última hora de cultivo no tratamento com Stt1. (G) Gráfico onde mostra a proliferação celular na última hora de cultivo através da incorporação de BrdU. N=4; Análise estatística realizada com teste-t não paramétrico. Aumento de 40x.

5.2.2 Stl1 não altera o número de células Mash1⁺

Mash1 é um dos fatores de transcrição que participa do controle inicial da diferenciação de neurônios simpáticos. Para avaliar se a Stl1 teria algum efeito sobre a população total de células Mash1 positivas, foram analisadas células Mash1⁺ (Figura 9B e 9E) e células totais, estas marcadas com DAPI (9A e 9D).

Foi observado um aumento no número total de células que expressam Mash1 de 5,69% com tratamento com Stl1 (Figura 9F) em relação a condição controle (Figura 9C), entretanto, não foi possível observar diferença significativa (Figura 9G).

Figura 8: Análise de células Mash1⁺



Fonte: Produzida pela autora (2017).

Nota: Imagens mostrando as células Mash1⁺ e células totais marcadas em DAPI. Em (A) imagem das células totais marcadas com DAPI na condição controle.

(B) Células da CNT que expressaram Mash1 em condição controle. (C) Sobreposição de imagens de células totais e células Mash1⁺. (D) Células totais com DAPI com tratamento de Sti1. (E) Células da CNT Mash1⁺ em tratamento com Sti1. (F) Sobreposição de imagem de células totais e células Mash1⁺ com tratamento com Sti1. (G) Efeito do Sti1 na expressão total de células Mash1⁺. N=4; Análise estatística realizada com teste-t de *Student* não paramétrico. Aumento de 40x.

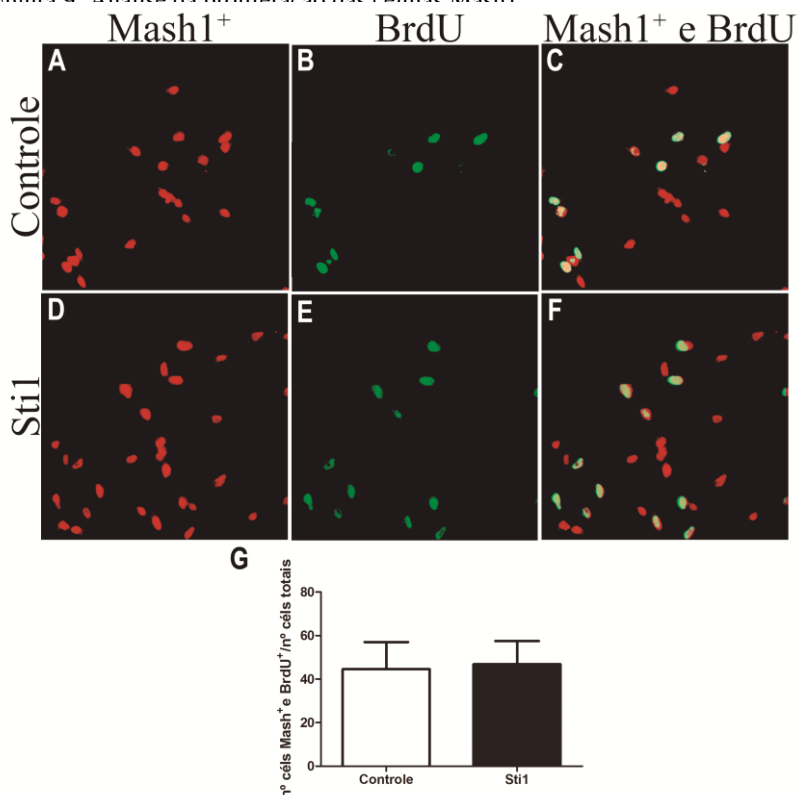
5.2.3 O Sti1 não afeta a proliferação de células Mash1⁺

As células da CNT apresentam-se como uma população muito heterogênea, formada por diversos progenitores (TRENTIN *et al.*, 2004; CALLONI *et al.*, 2007; CALLONI; LE DOUARIN; DUPIN, 2009). Dados anteriores do nosso grupo mostraram que Sti1 tem um forte efeito positivo sobre a diferenciação de neurônios.

Para verificar se Sti1 estaria atuando na proliferação de progenitores comprometidos com o fenótipo neuronal simpático (células Mash1⁺), foi utilizado a incorporação de BrdU na última hora de cultivo e após, foi realizado imunocitoquímica com anticorpo α -Mash1 e α -BrdU (Figura 10A, 10B, 10C e 10D).

A análise não mostrou diferença significativa, porém, o tratamento com Sti1 aumenta em 5,10% a proliferação de células Mash1⁺. Entretanto, foi considerado apenas células positivas para Mash1, não foi levado em consideração o nível de expressão. Esses dados demonstram que Sti-1 não apresenta efeito direto sobre a proliferação de células Mash1⁺.

Figura 9: Análise da proliferação das células Mash1⁺



Fonte: Produzida pela autora (2017).

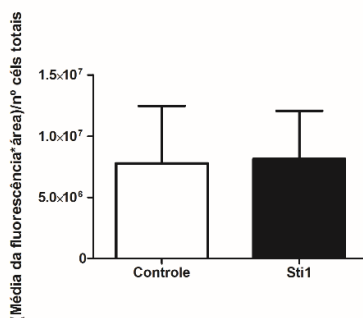
Nota: Imagem mostrando a incorporação de BrdU em células que expressam Mash1. (A) São células Mash1⁺ e (B) células que incorporaram BrdU, ambos da situação controle. Em (C) a sobreposição de imagem de células que expressaram Mash1 com células que proliferaram no grupo controle. (D) Células que expressam Mash1⁺ com tratamento com Sti1, (E) proliferação celular em tratamento Sti1. (F) Sobreposição de imagens de células Mash1⁺ e células que incorporaram BrdU em tratamento com Sti1. (G) Efeito do Sti1 na proliferação de células Mash1⁺. N=4; Análise estatística realizada com teste-t de Student não paramétrico. Aumento de 40x.

5.2.4 Sti1 não afeta os níveis de expressão de Mash1⁺ das células da CN

Afim de ter um indicativo de um possível efeito do Sti1 sobre os níveis de expressão de Mash1, foi medida a intensidade da fluorescência

emitida pelas células Mash1⁺. Nessas análises não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controle e St1. É possível que a heterogeneidade dos progenitores da CNT esteja de alguma forma mascarando possíveis diferenças. Uma análise em células individuais da intensidade de fluorescência, em células Mash1⁺, poderia esclarecer essa dúvida.

Figura 10: Análise da expressão de total de Mash1 através de imuno-fluorescência



Fonte: Produzida pela autora (2017).

Nota: Gráfico mostrando o efeito do St1 na expressão de Mash1 através da fluorescência total das células. N=4; Análise estatística realizada com teste-t de *Student* não paramétrico.

5.3 CULTURAS DE CÉLULAS DA CRISTA NEURAL COM TUBOS NEURAIIS DE DIFERENTES NÍVEIS ÂNTEROPOSTERIOR

As células da CN migram extensivamente a partir das bordas dorsais do tubo neural adjacentes aos últimos 10 somitos, em aves (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; TRAINOR, 2014). Antes mesmo do TN fechar completamente, inicia o processo de delaminação, onde as células migrarão do neuroepitélio para vários locais do embrião. Alguns autores demonstram que, *in vivo*, as células da CNT, que formarão determinados tipos celulares, apresentam certa ordem de saída do TN. Destes podemos citar os progenitores de neuronais sensoriais, neuronais simpáticos, células gliais e por último, melanócitos (LE DOUARIN & KALCHEIM, 1999; HALL, 2009).

Ao analisar os dados provindos de culturas de células da CNT, referente aos 10 últimos somitos formados, não foi observada diferença

na expressão de Mash1 sob tratamento com St1. Esse resultado pode ter sido decorrente da homogeneização dos diferentes progenitores presentes no tipo de cultivo realizado. Estudos como de Krispin e colaboradores (2010), *in vivo*, demonstram que há uma ordem pré-estabelecida de migração de progenitores. Logo, as primeiras células a migrarem seriam os progenitores neuronais simpáticos, após, as células que darão origem ao gânglio de raiz dorsal e por último os melanócitos. Portanto, foi estabelecido um novo método de cultura, onde foi separado o TN da região anterior, adjacente aos somitos 15-20 (TNA) e o TN posterior, adjacente aos somitos 21-24 s (TNP), para que fosse possível observar as individualidades de cada região.

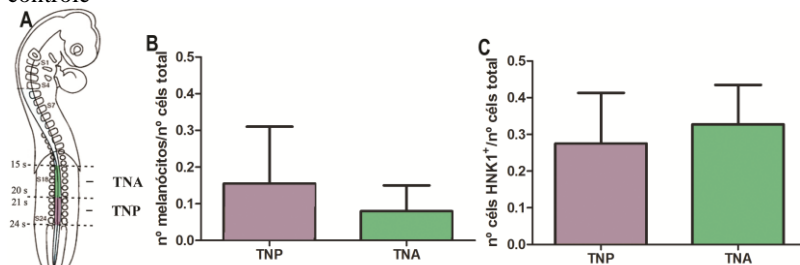
Até o momento não existem informações na literatura sobre o comportamento de saída das células da CNT *in vitro*. Não se sabe se as células da CNT *in vitro* teriam o mesmo perfil de delaminação observado *in vivo*.

5.3.1 Células da CNT, derivadas do TNA e TNP não apresentam diferenças entre si quanto à diferenciação de melanócitos e células gliais

Foram realizadas 5 culturas em condição controle, onde o TNA e TNP foram isolados e colocados em meio básico separadamente (Figura 12A), para que fosse possível observar eventuais especificidades na delaminação dos progenitores da CNT. É importante ressaltar que os dois segmentos do TN utilizados foram dissecados de embriões da mesma idade. Isso quer dizer que a diferença entre eles está no tempo de formação, ou seja, o TNA foi formado antes do TNP. As células da CNT que migram a partir do TNP seriam equivalente as primeiras células a delaminarem, já as células da CNT que migram a partir do TNA, seriam equivalentes as células de migração mais tardia.

Foi observado um aumento de 51,47% de melanócitos no TNP em relação do TNA (Figura 12B). Ao analisar células gliais, foi obtido um aumento de 18,90% no TNA em relação ao TNP (Figura 12C). Apesar de expressivas, essas diferenças entre os derivados da CNT anterior e posterior, não apresentaram diferenças estatísticas. De qualquer forma, esses dados nos mostram claramente que, sem o contexto embrionário, a dinâmica de delaminação das células da CNT, *in vitro*, não segue a mesma ordem que ocorre *in vivo*.

Figura 11: Análise de células gliais e melanócitos do TNA e TNP em grupo controle



Fonte: Produzida pela autora (2017).

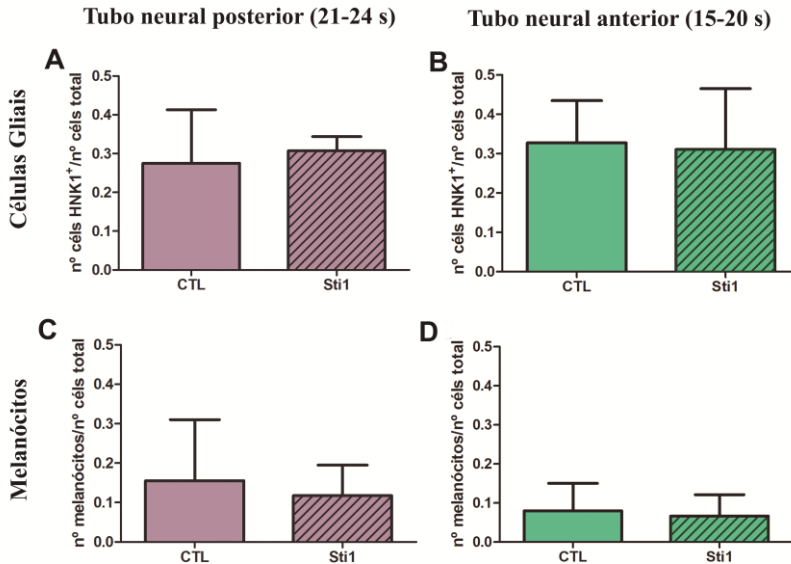
Nota: Embrião representando as culturas dos diferentes níveis axiais do tubo neural. Gráficos representam melanócitos e células gliais presentes em culturas de células da CN em situação controle nos diferentes níveis anteroposterior. (A) Embrião delimitando os locais onde foram utilizados os tubos neurais para as culturas de TNA e TNP, com suas cores correspondentes aos gráficos. (B) Análise de melanócitos na cultura de células isoladas do TNP em rosa e TNA em verde. (C) Análise de células gliais no grupo controle em culturas de TNA e TNP. N=5; Análise estatística realizada com teste-t de *Student* não paramétrico.

5.3.2 O *Sti1* não altera o número de células gliais e melanócitos derivados de diferentes níveis axiais do embrião.

Ao analisar melanócitos e células gliais derivados de células da CNT de TNA (Figura 13B e 13D) e TNP (Figura 13A e 13C) em situações controle e tratadas com *Sti1*, não foram obtidos resultados significativos. Apesar de haver aumento de 11,69% de células gliais no tratamento com *Sti1*, em relação à cultura controle no TNP (Figura 13A). Ao analisar melanócitos derivados das células da CNT do TNP (Figura 13C) foi observada uma diminuição de 5,08% destes no tratamento com *Sti1*.

As células que migraram do TNA, tratadas com *Sti1*, demonstraram uma diminuição de 24,21% de células gliais (Figura 13B) e 16,93% em melanócitos (Figura 13D) em relação ao controle. Entretanto essas diferenças observadas não se mostraram significativas.

Figura 12: Análise do efeito do Stl1 em células gliais e melanócitos do TNA e TNP



Fonte: Produzida pela autora (2017).

Nota: Gráficos representando o efeito do Stl1 sobre a diferenciação de células da CNT derivadas de diferentes níveis axiais do tubo neural. (A) Efeito do Stl1 sobre a diferenciação de células gliais derivadas da CNT isolada do TNP. (B) Efeito do Stl1 sobre a diferenciação de células gliais derivadas da CNT isolada do TNA. (C) Efeito do Stl1 sobre a diferenciação de melanócitos derivados da CNT isolada do TNP. (D) Efeito do Stl1 sobre a diferenciação de melanócitos derivados da CNT isolada do TNA. N=5; Análise estatística realizada com teste-t de *Student* não paramétrico.

5.3.3 Culturas de diferentes níveis do eixo ânteroposterior não apresentam neurônios

Ao analisar os ensaios imunocitoquímicos de fluorescência com α -NF200 não foi possível observar neurônios. Esta ausência no grupo controle e tratado com Stl1 trata-se, possivelmente, de um artefato metodológico, pois trabalhos anteriores do grupo demonstraram que células da CNT cultivadas diferenciam para neurônios *in vitro* em condições muito semelhantes às utilizadas (GARCEZ *et al.*, 2009).

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso laboratório demonstraram que o tratamento com Stl1 nas primeiras 24 horas de migração das células da CN proporciona um aumento de cerca de 5 vezes em neurônios e uma diminuição de 4 vezes de células gliais. Em contrapartida, a Stl1 proporcionou um aumento de 2 vezes em melanócitos (SCHMITT, 2009). Oliveira, (2015), demonstrou que Stl1 é capaz de modular a expressão de Sox10, um importante fator regulados da diferenciação da CNT (OLIVEIRA, 2015). Em conjunto, esses dados sugerem que Stl1 poderia influenciar a diferenciação das células da CNT, modulando a expressão de fatores de transcrição. Além disso, os dados que temos sobre Stl1, até o momento, mostram o efeito dessa proteína na fase de migração das células da CNT, entretanto ainda não há evidências que Stl1 atuaria diretamente nas células da CNT ou, indiretamente, via TN. Para elucidar tais questionamentos, foi desenvolvida uma metodologia diferente da utilizada por Schmitt e Oliveira (Figura 14B), onde a Stl1 foi adicionada somente após a migração das células da CNT, quanto o TN já havia sido removido (Figura 14A). Os resultados observados neste trabalho sugerem que o efeito da Stl1 sobre a CNT seria dependente da presença do TN, provavelmente sobre progenitores mais indiferenciados da CNT.

O tratamento com Stl1 após a migração das células da CNT, não apresentou influência sobre a proliferação celular total. Dados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, onde o tratamento com Stl1 foi realizado quando as células da CNT ainda não delaminaram do TN, também não observaram diferenças (SCHMITT, 2009; OLIVEIRA, 2015). Esse resultado fortalece a hipótese que Stl1 atuaria modulando a expressão de fatores de transcrição. No entanto, como as células da CNT são extremamente heterogêneas, existe a possibilidade de Stl1 atuar na proliferação de progenitores específicos apenas.

Resultados anteriores do nosso laboratório mostram um efeito pró-neurogênico em células da CNT tratadas com Stl1 (SCHMITT, 2009). Então em uma segunda etapa, foi analisado proliferação de células Mash1⁺, já que este é um marcador de progenitor de neurônios simpáticos. Não foram observadas diferenças estatísticas na proliferação de células Mash1⁺. A princípio esses resultados parecem discrepantes em relação às observações anteriores do grupo que demonstravam aumento de neurônios e modulação na expressão de Sox10, um fator de transcrição *upstream* a Mash1. É importante observar que Oliveira

(2015) utilizou *Sti1* durante a fase de migração e diferenciação (Figura 14B) e o presente trabalho verificou o efeito de *Sti1* apenas na fase de diferenciação (Figura 14A). A não observação do efeito de *Sti1*, quando adicionado na fase de diferenciação, pode ser explicada pelas células da CN já estarem comprometidas com algum progenitor, logo, *Sti1* atuaria em progenitores menos diferenciados, como observado por Oliveira, 2015 e Schmitt, 2009. Além disso, ambos os trabalhos realizam o tratamento com *Sti1* durante na presença do TN. Curiosamente, Beraldo e colaboradores (2013) observaram que camundongos *knock-out* para *Sti1* não sobrevivem aos 10 dias de desenvolvimento embrionário. A morte dos embriões foi constatada logo após a migração das células da CN. (BERALDO *et al.*, 2013).

Figura 13: Linha temporal das culturas realizadas pela autora e por Oliveira, 2015



Fonte: Produzida pela autora (2017)

Nota: Linha temporal referente aos experimentos realizados pela autora e por Oliveira, 2015. Em (A) Cultura realizada no presente trabalho, onde *Sti1* foi adicionado nas últimas 33 horas de diferenciação celular. Em (B) modelado do experimento realizado por Oliveira, 2015, onde *Sti1* foi adicionado em todas as fases da cultura celular.

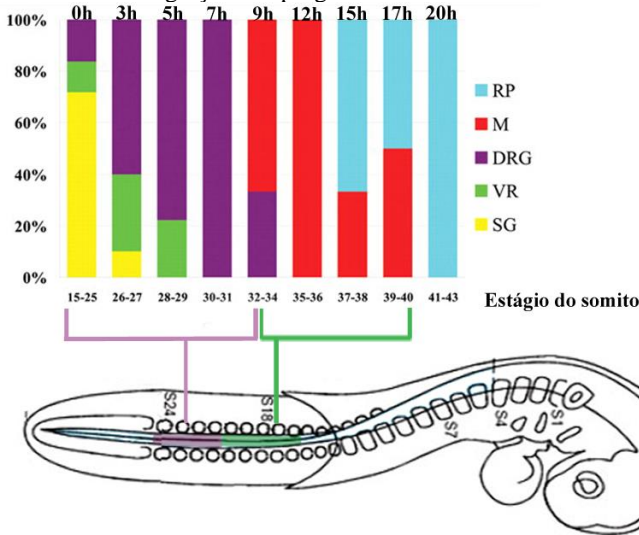
Interessantemente, foi observado que cerca de 60 a 70% das células da CNT cultivadas expressavam *Mash1*, entretanto, estudos anteriores demonstram que entre 1- 4% das células totais em culturas da CNT diferenciam para neurônios (GARCEZ *et al.*, 2009; BITTENCOURT *et al.*, 2013). Todas essas células que expressaram *Mash1* diferenciariam em neurônios simpáticos? Ou semelhante ao que Oliveira (2015) observou com *Sox10*, seria os diferentes níveis de *Mash1* que direcionaria as células para determinados fenótipos?

Logo, foi proposta uma análise mais detalhada da expressão de Mash1 e caso fosse observada diferença entre os níveis de fluorescência de Mash1, seria realizado um ensaio imunocitoquímico com Sox10 para comparar os níveis de fluorescência de Sox10 e Mash1. Essa consistiu em verificar a fluorescência total das células que expressaram este fator do grupo controle e tratado com Stl1. Ao analisar os dados, não foi observada diferença estatística, ou seja, o Stl1 não atua na expressão de Mash1. Tal resultado pode ter ocorrido, talvez, pela falta de Stl1 no começo da migração celular, pois como foi observado com outro fator solúvel, o Egf. Este atuaria via TN ou no momento da migração das células da CN, onde estas não estão comprometidas com um determinado fenótipo (GARCEZ *et al.*, 2009).

Os experimentos realizados com células da CNT, isoladas do tubo neural correspondente aos 10 últimos somitos, devido a sua grande diversidade de progenitores, pode mascarar pequenas diferenças em populações celulares mais restritas. Sendo assim, foi testado o efeito de Stl1 e foram realizados experimentos onde os tubos neurais foram divididos em duas partes distintas, o TNA e o TNP (Figura 5).

Krispin e colaboradores (2010) observaram, *in vivo*, que há uma ordem de migração das células da CN. As primeiras células a migrarem são as progenitoras de neurônios simpáticos, seguido pelas células de Schwann, após células que darão origem a neurônios sensoriais e por último, progenitores de melanócitos (Figura 13). Se essa dinâmica de migração dos progenitores da CNT que ocorre *in vivo*, também se repetir *in vitro*, o modelo de cultivo de células da CNT, utilizado até o momento não seria o mais apropriado para responder as questões levantadas nesse trabalho. Sendo assim, foi cultivado células da CNT providas de dois diferentes níveis axiais do TN. Curiosamente não observamos tais diferenças em relação aos tipos celulares analisados, melanócitos e células gliais. Nossos resultados demonstram o contrário do esperado, foi observado um aumento de 51,47% de melanócitos em células da CNT derivadas do TNP em relação ao TNA. Além disso, foi observado um aumento de 18,90% nas células gliais derivadas da CNT que migrou a partir do TNA, em relação ao TNP. Esses dados nos mostram que, *in vitro*, o comportamento ordenado da migração celular não ocorre como é demonstrado *in vivo*. E essa discrepância pode indicar que o microambiente tenha um efeito mais efetivo sobre a determinação inicial e diferenciação das células da CNT que esses autores sugerem.

Figura 14: Escala de migração dos progenitores



Fonte: Adaptado de LE DOUARIN, 2004 e KRISPIN *et al.*, 2010.

Nota: Representação gráfica da escala de migração dos progenitores da CN com seu respectivo estágio no embrião. Onde RP é teto do TN; M, melanócitos; DRG, gânglio da raiz dorsal; VR, raiz ventral e SG, gânglio simpático.

Adameyko e colaboradores (2009) demonstraram que células progenitoras gliais, que migrariam precocemente, poderiam dar origem a melanócitos na pele. Essas células da CNT migram dorso-ventro-lateralmente e diferenciam em neurônios e células progenitoras de células da Schwann (CPCS), que são Sox10⁺ e Krox20⁻. Essas células migram através dos nervos e quando obtém certo estímulo, diferenciam em melanócitos (ADAMEYKO *et al.*, 2009). Através deste estudo é possível sugerir que os melanócitos derivados do TNP seriam CPCS.

Sela-Donenfeld e Kalcheim (2000) observaram que os somitos influenciam na migração celular assim como nos fatores presentes no microambiente. Pois com a somitogênese, que atua na direção rostro caudal, é criada um gradiente de fatores que modulam a expressão de Noggin na linha dorsal do TN, no qual modifica os níveis de BMP, que consequentemente, inicia a migração das células da CNT. Sem essa modulação decorrente da somitogênese, há uma alta concentração de Noggin no microambiente embrionário que leva ao bloqueio de BMP, impedindo a migração das células da CNT (SELA-DONENFELD;

KALCHEIM, 2000). A cultura realizada no presente trabalho apenas utilizou o TN, excluindo assim os somitos e tecidos circundantes. Estudos recentes de nosso laboratório com embriões *ex vivo*, mostraram resultados que sugerem que o Stl1 seria um dos fatores que poderiam estimular Noggin, que bloquearia BMP e que consequentemente não ativaria a cascata para a expressão de HNK1 (CUNHA, 2017). Logo, o microambiente antes favorável para a diferenciação celular de fenótipos como melanócitos, foi suprimido e outros fenótipos celulares foram amplificados. Como por exemplo, as células gliais presentes no TNA, como observado na figura 7.

Ao analisar o efeito do Stl1 em células da CNT derivadas do TNA e TNP, não foi observada diferença estatística no número de células gliais e de melanócitos entre os grupos controle e tratados com Stl1. Uma hipótese já levantada anteriormente para explicar estes dados, seria que Stl1 atuaria diretamente sobre o TN, ou sobre as células da CN que ainda não migraram, ou seja, em precursores menos indiferenciados, corroborando com o observado com Schmitt, (2009) e Oliveira, (2015). Outro dado para ser discutido seria que apesar de não obter diferença significativa com o tratamento com Stl1, foi observado um aumento de 11,69% de células gliais e uma diminuição de 5,08% de melanócitos provindos do TNA. Uma suposição para tal resultado seria que o Stl1 estaria regulando a Endotelina 3 (ET3) e fazendo os progenitores mais diferenciados, como o glia-melanócitos seguir a rota para a diferenciação em células gliais em detrimento a melanócitos (DUPIN et al., 2000). Já progenitores menos diferenciados, como as células provindas do TNP, estariam tomando outra rota de diferenciação, diminuindo assim, células gliais e melanócitos (Figura 8B e 8D).

Não foram observados neurônios nas culturas com o TN segmentado em grupo controle e tratado com Stl1. Uma das hipóteses levantadas seria a falta de fatores solúveis no meio de cultura, *in vitro*, como a grande família dos Fgfs (SERVETNICK; GRAINGER, 1991), Egfs (GARCEZ *et al.*, 2009) e hormônios como insulina, glucagon e triiodotironina (T₃) (TRENTIN *et al.*, 2004). Trabalhos como de Bittencout *et al.*, 2013 e Garcez *et al.*, 2009 mostram que a sobrevivência de neurônios se dá, entre outros motivos, pelo uso de um meio de cultivo enriquecido com diferentes fatores de crescimento, hormônios e proteínas carreadoras como a transferrina. A não observação de neurônios em cultura da CNT seria causada pela falta deste meio de cultura enriquecido. Já que a transferrina é responsável pela condução de ferro para as células que estão proliferando, logo, em sua ausência, os neurônios que iriam proliferar, acabam morrendo. O

hormônio T_3 que é responsável pela elevação da atividade de enzimas do metabolismo oxidativo, em sua privação, as células não conseguiriam produzir ATP (adenosina trifosfato) que acabaria levando à apoptose (NUNES, 2003). Este hormônio também é responsável pela modificação da ação transcricional de determinados genes (GUISSOUMA *et al.*, 1998), logo, a T_3 poderia atuar em genes importantes para a sobrevivência neurônios. Consequentemente, a falta deste meio de cultura enriquecido com determinados fatores tornou o microambiente propenso a não formação de neurônios (BAROFFIO, DUPIN, LE DOUARIN, 1988).

O tratamento com *Sti1* na fase de diferenciação celular mostrou não alterar de forma significativa nenhuma população celular estudada. Apesar de não apresentar diferenças significativas, esses resultados são extremamente importantes, pois assim é possível compreender que a atuação da *Sti1* acontece em estágios mais indiferenciados das células da CNT ou ainda, de forma indireta sobre elas. Ou seja, a *Sti1* modula a expressão das células da CNT em uma janela restrita de tempo, semelhante ao observado por Calloni e colaboradores (2007), ao utilizar *Shh* nas primeiras 48 h de cultura celular e por Garcez *et al.*, 2009, que também observou que o tratamento com *Egf* nas primeiras horas de cultivo causava aumento de progenitores neuronais e melanocíticos.

7 CONCLUSÕES

- Stl1 não apresenta efeito sobre a proliferação e expressão de Mash1 em células da CNT, quanto o tratamento é realizado após a migração das células da CN.
- As células da CNT, *in vitro*, não apresentam o mesmo padrão de migração que ocorre *in vivo*. Os progenitores provavelmente não obedecem uma ordem de saída, ao longo do eixo anteroposterior do TN.
- O efeito do Stl1 sobre a diferenciação das células da CNT é indireto, provavelmente, via TN, ou em progenitores muito precoces da CNT.

8 PERSPECTIVAS

Cada vez mais há indícios que o *Sti1* atua na diferenciação das células da CNT, assim como altera a expressão de *Sox10* *in vitro* (SCHIMITT, 2009; OLIVEIRA, 2015) e possivelmente esteja atuando na regulação *upstream* em relação a *Sox10*. O presente trabalho mostrou que *Sti1* pode atuar diretamente sob o TN, mostrando que o microambiente é extremamente importante para a diferenciação celular.

Estudos futuros serão realizados para responder questionamentos a cerca do efeito do *Sti1* nas primeiras horas de migração para observar diferenciação neuronal, no período de 120 horas de cultura. Também, é necessária uma análise da expressão de *Mash1* nas primeiras 48 de migração em tubos TNA e TNP para observar se realmente os progenitores simpáticos estão migrando da região posterior do TN, como observado *in vivo*, por Krispin e colaboradores (2010) ou se a hipótese apresentada neste trabalho acerca das CPCS é verdadeira. Assim como analisar outros fatores de transcrição regulados por *Sox10*, como *Islet1*, e *Egr2*.

9 REFERÊNCIAS

ADAMEYKO, I. et al. Schwann Cell Precursors from Nerve Innervation Are a Cellular Origin of Melanocytes in Skin. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 366–379, 2009.

AOKI, Y. et al. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. **Developmental Biology**, v. 259, n. 1, p. 19–33, jul. 2003.

ARBEITMAN, M. N.; HOGNESS, D. S. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. **Cell**, v. 101, n. 1, p. 67–77, 2000.

BAGGIOLINI, A. et al. Premigratory and Migratory Neural Crest Cells Are Multipotent In Vivo. **Cell Stem Cell**, v. 16, n. 3, p. 314–322, mar. 2015.

BERALDO, F. H. et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 has unique cochaperone activity during development and regulates cellular response to ischemia via the prion protein. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 9, p. 3594–607, 1 set. 2013.

BHARADWAJ, S.; ALI, A.; OVSENEK, N. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. **Mol Cell Biol**, v. 19, n. 12, p. 8033–8041, 1999.

BRONNER-FRASER, M.; FRASER, S. E. Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells. **Nature**, v. 335, n. 6186, p. 161–4, 1988.

CALLONI, G. W. et al. Sonic Hedgehog promotes the development of multipotent neural crest progenitors endowed with both mesenchymal and neural potentials. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 50, p. 19879–19884, 2007.

CALLONI, G. W.; LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 8947–8952, 2 jun. 2009.

CREUZET, S.; COULY, G.; DOUARIN, N. M. Patterning the neural crest derivatives during development of the vertebrate head: insights from avian studies. **Journal of Anatomy**, v. 207, n. 5, p. 447–459, 2 nov. 2005.

CUNHA, J. I. da. **Fosfoproteína Induzida por Estresse do Tipo**

1 (Sti1) atua sobre a fase inicial de desenvolvimento da crista neural. 2017. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

DUPIN, E. et al. Endothelin 3 induces the reversion of melanocytes to glia through a neural crest-derived glial-melanocytic progenitor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 7882–7887, 5 jul. 2000.

ETCHEVERS, H. Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells. **Nature Protocols**, v. 6, n. 10, p. 1568–1577, 2011.

GAMMILL, L. S.; ROFFERS-AGARWAL, J. Division of labor during trunk neural crest development. **Developmental Biology**, v. 344, n. 2, p. 555–565, 2010.

GARCEZ, R. C. et al. Epidermal growth factor (EGF) promotes the in vitro differentiation of neural crest cells to neurons and melanocytes. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 29, n. 8, p. 1087–1091, 2009.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 10ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2014.

HAIJ, G. N. M. et al. Developmental expression of prion protein and its ligands stress-inducible protein 1 and vitronectin. **Journal of Comparative Neurology**, v. 517, n. 3, p. 371–384, 20 nov. 2009.

HALL, Brian K. **The Neural Crest and Neural Crest Cells in Vertebrate Development and Evolution**. New York: Springer, 2009. 410 p.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49–92, jan. 1951.

HU, J. et al. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins. **Journal of virology**, v. 76, n. 1, p. 269–79, jan. 2002.

JOHNSON, B. D. et al. Hop Modulates hsp70 / hsp90 Interactions in Protein Folding . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 6, p. 3679–3686, 1998.

KÖNTGES, G.; LUMSDEN, A. Rhombencephalic neural crest segmentation is preserved throughout craniofacial ontogeny. **Development (Cambridge, England)**, v. 122, n. 10, p. 3229–42, out. 1996.

KRISPIN, S. et al. Evidence for a dynamic spatiotemporal fate map and early fate restrictions of premigratory avian neural crest. **Development**, v. 137, n. 4, p. 585–595, 2010.

LÄSSLE, M. et al. Stress-inducible, murine protein mSTI1: Characterization of binding domains for heat shock proteins and in vitro phosphorylation by different kinases. **the Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 3, p. 1876–1884, 1997.

LE DOUARIN, N. M. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637–4650, 1 out. 2004.

LE DOUARIN, N. M. & KALCHEIM, C. **The Neural Crest**. 2ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.

LE DOUARIN, N. M.; TEILLET, M. A. The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 30, n. 1, p. 31–48, ago. 1973.

LE LIÈVRE, C. S.; LE DOUARIN, N. M. Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 34, n. 1, p. 125–54, ago. 1975.

LIMA, F. R. S. et al. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 6, p. 2164–2176, dez. 2007.

LOPES, M. H. Interaction of Cellular Prion and Stress-Inducible Protein 1 Promotes Neuritogenesis and Neuroprotection by Distinct Signaling Pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 49, p. 11330–11339, dez. 2005.

MARTIK, M. L.; BRONNER, M. E. Regulatory Logic Underlying Diversification of the Neural Crest. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 10, p. 715–727, 2017.

MARTINS, V. R. et al. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nature Medicine**, v. 3, n. 12, p. 1376–1382, 1 dez. 1997.

MEULEMANS, D.; BRONNER-FRASER, M. Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. **Developmental Cell**, v. 7, n. 3, p. 291–299, 2004.

MURPHY, M. et al. FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. **Development (Cambridge, England)**, v. 120, n. 12, p. 3519–3528, 1994.

OLIVEIRA, E. S. de. **A proteína induzida por estresse do tipo 1 (STI-1) atua sobre a expressão de SOX10 durante a diferenciação inicial das células da crista neural**. 2015. 73 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015. Disponível

em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/174759>>. Acesso em: 03 dez. 2017.

PARATORE, C. et al. Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. **Development (Cambridge, England)**, v. 128, n. 20, p. 3949–61, out. 2001.

ROFFE, M. et al. Prion protein interaction with stress-inducible protein 1 enhances neuronal protein synthesis via mTOR. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 29, p. 13147–13152, 2010.

SAUKA-SPENGLER, T.; BRONNER-FRASER, M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 7, p. 557–568, 4 jul. 2008.

SCHMITT, S. dos S. **Análise da influência da proteína príon celular (PrPc) e de seu ligante, a fosfoproteína induzida por estresse do tipo 1 (STI1), na diferenciação das células-tronco da crista neural truncal, in vitro**. 2009. 56 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/132488>>. Acesso em: 03 dez. 2017.

SELA-DONENFELD, D.; KALCHEIM, C. Inhibition of noggin expression in the dorsal neural tube by somitogenesis: a mechanism for coordinating the timing of neural crest emigration. **Development (Cambridge, England)**, v. 127, n. 22, p. 4845–4854, 2000.

SERVETNICK, M.; GRAINGER, R. M. Homeogenetic neural induction in xenopus. **Developmental Biology**, v. 147, n. 1, p. 73–82, set. 1991.

SHAH, N. M.; ANDERSON, D. J. Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 21, p. 11369–11374, 14 out. 1997.

SIMOES-COSTA, M.; BRONNER, M. E. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, v. 142, n. 2, p. 242–257, 15 jan. 2015.

SOMMER, L. Context-dependent regulation of fate decisions in multipotent progenitor cells of the peripheral nervous system. **Cell and Tissue Research**, v. 305, n. 2, p. 211–216, 20 ago. 2001.

SOMMER, L. Growth factors regulating neural crest cell fate decisions. **Adv Exp Med Biol**, v. 589, p. 197–205, 2006.

STOLT, C. C.; WEGNER, M. Schwann cells and their

transcriptional network: Evolution of key regulators of peripheral myelination. **Brain Research**, v. 1641, p. 101–110, jun. 2016.

TEILLET, M.-A.; KALCHEIM, C.; LE DOUARIN, N. M. Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: Segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. **Developmental Biology**, v. 120, n. 2, p. 329–347, abr. 1987.

TRAINOR, P. A. **Neural Crest Cells: Evolution, Development and Disease**. San Diego, EUA: Elsevier, 2014.

TRENTIN, A.; GARCEZ, R. C.; BRESSAN, R. Neural crest stem cells cultures: establishment, characterization, and potencial use. In: ULRICH, H.; NEGRAES, P. D.. **Working with stem cells**. Suíça: Springer, 2016. Cap. 7. p. 215-231.

TRENTIN, A. et al. Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4495–4500, 2004.

WENZHI, H. et al. Heterozygous deletion at the SOX10 gene locus in two patients from a Chinese family with Waardenburg syndrome type II. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 10, p. 1718–1721, out. 2015.

ZANATA, S. M. et al. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO Journal**, v. 21, n. 13, p. 3307–3316, 2002.

ZILLER, C. et al. Early segregation of a neuronal precursor cell line in the neural crest as revealed by culture in a chemically defined medium. **Cell**, v. 32, n. 2, p. 627–638, 1983.